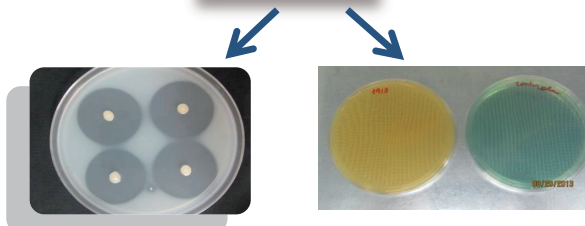
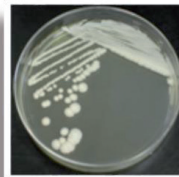
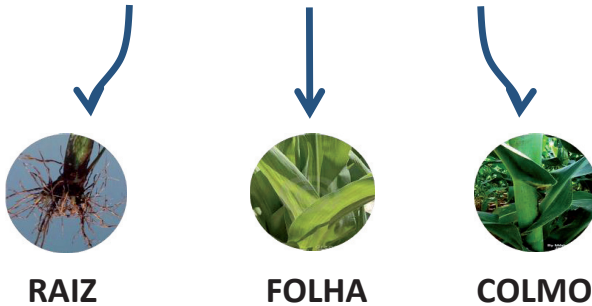


Potencial Biotecnológico de Bactérias Endofíticas de Milho



ISSN 1679-0154

Dezembro, 2015

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Milho e Sorgo

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 132

Potencial Biotecnológico de Bactérias Endofíticas de Milho

Vitória Palhares Ribeiro

Eliane Aparecida Gomes

Ivanildo Evódio Marriel

Crísia Santos de Abreu

Ubiraci Gomes de Paula Lana

Christiane Abreu de Oliveira Paiva

Embrapa Milho e Sorgo

Sete Lagoas, MG

2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges

Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Monica Matoso

Campanha, Roberto dos Santos Trindade, Rosângela Lacerda de

Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Montagem fotos de Eliane A. Gomes et al.

1ª edição

Versão Eletrônica (2015)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Milho e Sorgo

Potencial biotecnológico de bactérias endofíticas de milho / Vitória Palhares Ribeiro... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2015.

27 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 132).

1. Microrganismo. 2. Solubilização. 3. Nutrição vegetal. 4. *Zea mays*. I. Ribeiro, Vitória Palhares. II. Série.

CDD 571.2 (21. ed.)

© Embrapa 2015

Sumário

Resumo	4
Abstract	7
Introdução	8
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	14
Conclusões	21
Agradecimentos	21
Referências	21

Potencial Biotecnológico de Bactérias Endofíticas de Milho

Vitória Palhares Ribeiro¹

Eliane Aparecida Gomes²

Ivanildo Evódio Marriel³

Crísia Santos de Abreu⁴

Ubiraci Gomes de Paula Lana⁵

Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁶

Resumo

Bactérias endofíticas são microrganismos que habitam o interior dos tecidos vegetais e são conhecidas promotoras do crescimento de plantas, favorecendo sua nutrição, pela solubilização de fosfatos, além de produzirem fito-hormônio, enzimas e sideróforos, apresentando potencial para uso como bioinoculantes. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias endofíticas de milho eficientes na solubilização de fosfatos de cálcio e de ferro e na produção de sideróforos, substâncias que atuam na captação de ferro.

¹Estudante, Centro Universitário de Sete Lagoas; Sete Lagoas, MG.
vitypalhares18@hotmail.com

²Bióloga, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, eliane.a.gomes@embrapa.br

³Eng.-Agrôn., Doutor, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, ivanildo.marriel@embrapa.br

⁴Mestranda, Universidade Federal de São João Del Rey, Sete lagoas, MG, crisiaabreu@gmail.com

⁵Químico, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, ubiraci.lana@embrapa.br

⁶Eng.-Agrôn., D.Sc. em Biologia Vegetal, Pesq. da Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG. christiane.paiva@embrapa.br

Para o isolamento das bactérias, foram coletadas plantas de milho no florescimento em área de cerrado, sendo estas posteriormente desinfestadas e maceradas para o isolamento dos endófitos. Foram isoladas 113 bactérias provenientes de raízes (54,9%), folhas (20,4%) e seiva de milho (24,8%). Dessas bactérias, 49 foram caracterizadas geneticamente com base na sequência do 16S rDNA e avaliadas quanto à capacidade de solubilização de fosfatos em meio de cultura líquido contendo fosfato de cálcio e de ferro e produção de sideróforos. Os isolados mais eficientes na solubilização de fosfato de cálcio e fosfato de ferro produziram entre 179,4 a 193,7 mgP. L⁻¹ e 62,7 a 68,7 mg P. L⁻¹, respectivamente. Foi observada uma correlação negativa de -0,58 e -0,48 entre a solubilização de fósforo nos dois fosfatos testados, P-Ca e P-Fe, e os valores de pH, respectivamente, indicando a produção de ácidos orgânicos como o principal mecanismo de solubilização de P. O sideróforo produzido por 69% dos microrganismos avaliados foi do tipo carboxilato. As bactérias endofíticas eficientes na solubilização de P foram identificadas principalmente como pertencentes ao gênero *Bacillus* e *Pantoea*. Foi possível concluir que as estirpes bacterianas provenientes do microbioma interno de milho cultivado em solo de cerrado possuem características promissoras de biossolubilização de fosfatos e promoção de crescimento de plantas, sendo possível neste estudo a seleção de seis isolados do gênero *Bacillus* para futuros testes de inoculação em plantas.

Palavras-chave: Endofíticos, microrganismos solubilizadores de fósforo, sideróforos, *Zea mays*

Biotechnological Potential of Endophytic Bacteria of Maize

Vitória Palhares Ribeiro¹

Eliane Aparecida Gomes²

Ivanildo Evódio Marriel³

Crísia Santos de Abreu⁴

Ubiraci Gomes de Paula Lana⁵

Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁶

Abstract

Bacterial endophytes are microorganisms that inhabit the interior of the plants and they are known to promote plant growth, improving their nutrition through phosphate solubilization, phytohormones, enzymes or siderophore production, showing potential for use as bio-inoculants. The objective of this work was to isolate and characterize bacteria endophytic of corn with efficient solubilization of iron and calcium phosphates and production of siderophores, substance that acts to sequester iron. For the isolation, plants of corn in the flowering state were collected in Cerrado area, disinfected and crushed for the isolation of the endophytic bacteria. From these plants, 113 bacteria were isolate from roots (54.9%), leaves (20.4%) and maize sap (24.8%). From these bacteria, 49 were genetically characterized based on the 16S rDNA sequence and tested for the phosphate solubilization in liquid medium containing calcium phosphate and iron and siderophore production. The most efficient isolates in the P-Ca and P-Fe solubilization produced from 179.4 to 193.7 mgP. L⁻¹

and from 62.7 to 68.7 mg L⁻¹ P, respectively. It was observed a negative correlation of -0.58 and -0.48 between P solubilization in the two phosphates tested, P-Ca and P-Fe and pH values, respectively, indicating the production of organic acids as the main mechanism of P solubilization. The siderophore produced by 69% of the microorganisms was carboxylate. The endophytic isolates efficient in P solubilization were identified mainly as the genera *Bacillus* and *Pantoea*. It was concluded that the bacteria strains from corn microbiome grown in Cerrado soil have promising features of P solubilization and promotion of growth, and six isolates of *Bacillus* were isolated for future inoculation tests in plants.

Key words: Endophytic, phosphorus solubilizing microorganisms, siderophores, *Zea mays*

Introdução

A cultura do milho tem papel importante dentro do cenário agropecuário nacional, em razão da sua ampla utilização, indo desde a indústria de rações e produção de alimentos para o consumo humano, até a produção de etanol. Para atender a esta demanda e atingir níveis elevados de produtividade, merece destaque a fertilidade do solo, com ênfase no fósforo (P), um dos macronutrientes mais limitantes à produção agrícola e com menor eficiência de uso pelas plantas (BALIGAR; FAGERIA, 2001). A precipitação e a fixação de P no solo são os principais responsáveis pela baixa eficiência dos fertilizantes fosfatados solúveis, sendo que a maior parte do fertilizante aplicado pode complexar com íons de ferro (Fe), alumínio (Al) e cálcio (Ca), o que o torna indisponível às plantas (NOVAIS; SMYTH, 1999). Para contornar este problema, é necessária a aplicação de

elevadas doses de fertilizantes, prática que onera os custos de produção, visto que o país importa cerca de 50% dos fertilizantes fosfatados utilizados atualmente, comprometendo a sustentabilidade e competitividade do agronegócio brasileiro (RODRIGUES et al., 2015).

Uma alternativa efetiva e sustentável para a solução deste problema seria uma combinação de práticas de manejo de solo e plantas e uma exploração racional de sua flora microbiana. Dentro deste contexto, o uso combinado de microrganismos solubilizadores de P (MSP) e fosfatos de rocha tem sido considerada uma estratégia promissora em termos ambientais e econômicos (KHAN et al., 2007; RICHARDSON, 2001; SINGH; REDDY, 2011; GOMES et al., 2014), apresentando resultados de ganhos de produtividade e de massa vegetal em várias culturas como alfaça (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999), trigo (SINGH; REDDY, 2011) e milho (PATIL et al., 2012). Estes microrganismos são capazes de disponibilizar o fósforo complexado no solo (WHITELAW, 2000; GOLDSTEIN et al., 2003), além de disponibilizar o fósforo de fontes orgânicas (RICHARDSON, 2001; OLIVEIRA et al., 2009; VASSILEV et al., 2012; RICHARDSON; SIMPSON, 2011). Os solos das áreas agrícolas do Brasil geralmente apresentam condição ácida e predomínio de fosfato de ferro (P-Fe) ou estrengita (BARROSO; NAHAS, 2008), existindo relatos de microrganismos do solo que solubilizam formas não disponíveis de P fixado em moléculas de ferro pela produção de sideróforos, peptídeos de síntese não ribossômica produzidos por microrganismos, que apresentam altíssima afinidade por ferro (SIMIONATO et al., 2010). Estas substâncias orgânicas podem atuar no biocontrole de patógenos e na captação de P complexado a Fe no solo (BARROSO; NAHAS, 2005).

Embora a maioria das pesquisas sobre MSP associado a plantas seja focada em rizobactérias, o interesse na diversidade e o papel das bactérias endofíticas tem aumentado (MALFANOVA et al., 2012). A principal razão para o interesse em endófitos é a constatação de que se estas bactérias podem ser reintroduzidas na fase endofítica, pode ser estabelecida aí uma relação mais estável entre a planta e bactérias do que entre plantas e bactérias da rizosfera ou bactérias epífitas (BACON; HINTON, 2011; HARDOIM et al., 2008). Além disso, as bactérias endofíticas provavelmente sofrem menos competição de outros microrganismos pelas fontes de carbono, além de usarem os mesmos mecanismos de promoção de crescimento de plantas que as bactérias da rizosfera (BERG et al., 2005). Dessa maneira, bactérias endofíticas que apresentam características que podem ser benéficas às plantas são potencialmente excelentes agentes promotores do crescimento de plantas ou de controle biológico para produção agrícola mais sustentável (ARAÚJO et al., 2000; ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006; HAMAYUN et al., 2009; MONTAÑEZ et al., 2012; BASHAN et al., 2014). No entanto, existem poucos relatos do potencial de uso destas bactérias como bioinoculantes e agentes de biossolubilização de fosfatos.

Neste trabalho, objetivou-se isolar e caracterizar bactérias endofíticas da cultura de milho quanto à eficiência na biossolubilização de P e produção de sideróforos.

Material e Métodos

Amostras de tecidos vegetais para obtenção dos endófitos foram coletadas da cultura de milho, durante o estágio de florescimento, em experimentos conduzidos no Cerrado, Latossolo Vermelho Distrófico, em área experimental da

Embrapa Milho e Sorgo (19°28'S 44°15'W), município de Sete Lagoas-MG. Os microrganismos endofíticos foram isolados de raízes, folhas e seiva de milho previamente desinfestadas. As folhas e as raízes foram lavadas em água corrente e em seguida desinfestadas superficialmente por meio de imersão em álcool 70% (v/v) por 2 minutos; 5 minutos em hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo (v/v) e novamente em álcool 70% (v/v) durante 30 segundos. Ao final do procedimento, todo o material foi lavado quatro vezes em água destilada esterilizada. Para a verificação da eficiência do processo de desinfestação, alíquotas da água destilada (0,1 mL) da última lavagem dos tecidos vegetais foram inoculadas em meio Ágar Batata Dextrosado (BDA) e incubadas a 25-28 °C durante 10 dias.

Isolamento de Bactérias Endofíticas

Para isolamento de bactérias endofíticas, amostras de 10 g das raízes e das folhas desinfestadas foram trituradas em areia estéril e acrescidas de 90 mL de NaCl 0,85% (p/v) e, então, diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} foram realizadas. Alíquotas de 100 µL de cada uma das diluições foram plaqueadas no meio BDA suplementado com 100 µg/mL nistatina. A seiva foi extraída por meio de ar comprimido e as diluições e o plaqueamento foram realizados conforme descrito para raízes e folhas. As placas foram incubadas a 28 °C por um período de 7 dias e os diferentes morfotipos de bactérias foram isolados, preservados, em duplicata, em glicerol 30% (v/v) a -80 °C e também mantidos por repiques sucessivos a 4 °C em tubos de penicilina contendo BDA e óleo estéril.

Solubilização de Fosfato em Meio Líquido

Um total de 49 estirpes pré-selecionadas em meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999) sólido, com base na presença de halos claros ao redor da colônia, foram avaliadas quanto à eficiência de solubilização de P em meio NBRIP líquido, contendo fosfato tricálcio ou fosfato de ferro. Colônias puras de cada isolado foram crescidas em meio de cultura líquido TSB (*Trypticase Soy Broth*), durante cinco dias, sob agitação a 120 rpm, à temperatura de 30°C. Após este período, a turbidez de cada cultura foi ajustada com solução Salina (0,85%) para uma unidade de densidade ótica a 540 nm. Alíquotas de 100 µL de cada suspensão de células padronizada foram transferidas para tubos cônicos de 50 mL contendo 15 mL de meio líquido NBRIP, com modificações na concentração de glicose para 40 g.L⁻¹. Após incubação por 9 dias, sob agitação, à temperatura de 30 °C, os valores de pH foram determinados, e os teores de P solúvel liberados no sobrenadante das culturas foram quantificados pelo método colorimétrico preconizado por Murphy e Riley (1962).

Produção de Sideróforos

Previamente todas as vidrarias foram tratadas com HCl 6 M para que todo resíduo de ferro pudesse ser removido. As bactérias foram inoculadas em 2 mL de meio LB (Lurian Bertani) e mantidas sob agitação a 200 rpm, 37 °C por 16 h. Para a detecção dos sideróforos, 10 µL da cultura de bactérias foram inoculados em meio Ágar Nutriente e as placas foram mantidas a 37 °C por 16 h. Posteriormente, foi aplicado sobre as placas o meio overlay CAS (SCHWYN; NEILANDS, 1987), modificado conforme a metodologia proposta por Pérez-Miranda et al. (2007), como descrito a seguir: 60,5 mgL⁻¹ de cromo azurol S,

72,9 mgL⁻¹ de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), 30,24 gL⁻¹ de piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfônico) (PIPES), e 1 mM de FeCl₃.6H₂O diluído em 10 mL de HCl 10 mM. Como agente gelificante, foi utilizada agarose 0,9% (p/v). As placas foram mantidas no escuro a 25 °C.

A presença de sideróforos foi revelada após um período que variou em torno de quatro dias. De acordo com a coloração apresentada, os sideróforos foram classificados em três tipos: catecol (azul para rosa); hidroxamato (azul para laranja); carboxilato (azul para amarelo claro).

Caracterização Molecular

O DNA genômico foi extraído das bactérias a partir de culturas incubadas em meio LB a 37 °C por 24 horas utilizando a metodologia de fenol/clorofórmio, adaptada de Ausubel et al. (1987), e a região 16S do rDNA foi amplificada com os primers F968 e R1401 (NÜBEL et al., 1996). A reação de PCR foi realizada num volume final de 50 µL, contendo 20 ng de DNA, Tris-HCl 10 mM pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 2,5 mM; dNTPs 0,125 mM, primers 0,4 µM; 1,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e formamida 1% (v/v). A amplificação foi realizada utilizando as seguintes condições: 94 °C por 2 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min, com uma extensão final de 72 °C por 10 min para as bactérias. Para os fungos, a amplificação foi realizada utilizando as seguintes condições: 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min, 72 °C por 90 seg, com uma extensão final de 72 °C por 7 min. Os produtos da reação foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) corados com brometo de etídeo (1µg mL⁻¹) e visualizados no equipamento Gel Logic 200 (KODAK

Company, Rochester, NY, EUA). Os produtos da amplificação foram removidos do gel, purificados com o kit “QIAquick Gel Extraction” (Qiagen, Hilden, Alemanha) e sequenciados utilizando-se o Kit “Big Dye Terminator” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. As amostras foram analisadas no sequenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), sendo as sequências comparadas com o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o programa Blast N (ALTSCHUL et al., 1997).

Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições por amostra, sendo submetidos individualmente todos os parâmetros à análise de variância utilizando-se o programa Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2011) e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F ($p \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises de correlação de Pearson foram realizadas utilizando o programa Excel a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Foram isolados 113 morfotipos bacterianos sendo 62 (54,9%) da raiz, 28 (24,8%) provenientes de seiva e 23 (20,4%) da folha. Destes, 49 foram caracterizados molecularmente e avaliados para solubilização de fósforo e produção de sideróforos (Tabela 1). Quanto à caracterização genética, observaram-se valores de similaridades entre 95% e 100% com os gêneros *Bacillus* e *Pantoea* principalmente. O gênero endofítico predominante para solubilização de P-Ca foi *Bacillus* e para solubilização de

P-Fe foi o gênero *Pantoea*. Endófitos facultativos, tais como *Bacillus*, *Enterobacter*, *Azospirillum* podem colonizar a rizosfera e endosfera e fornecer maior mobilização de nutrientes para as plantas e agir como potencial MSP, além de estimular a tolerância ao estresse, aumentar a resistência das plantas às doenças, atuando como antagonistas competitivos e induzir os sistemas de defesa das plantas (HARDOIM et al., 2012; MONTAÑEZ et al., 2012).

Ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) na solubilização de P do fosfato de cálcio e ferro entre os diferentes isolados. As estirpes 1920 (bactéria não cultivada), 2088 (*Bacillus* sp.), 2091 (bactéria não cultivada), 2093 (bactéria não cultivada), 2106 (*B. megaterium*), 2107 (bactéria não cultivada) e 2110 (*Bacillus* sp.) apresentaram os maiores valores de liberação de P solúvel a partir de fosfato de cálcio, variando de 179,39 mg P. L⁻¹ a 193,71 mg P. L⁻¹. Observou-se redução significativa ($p < 0,05$) para os valores de pH entre os isolados testados aos 9 dias de cultivo.

A solubilização de fosfato de ferro foi mais alta, com relação ao controle não inoculado, para os isolados 1934 (*P. ananatis*), 1935 (bactéria não cultivada), 1976 (*Bacillus* sp.), 1984 (*P. dispersa*) e 2111 (*Bacillus* sp.) com a liberação de 62,67 mg P. L⁻¹ a 68,67 mg P. L⁻¹, após 9 dias de incubação (Tabela 1). Valores similares foram observados para *Aspergillus niger* por Barroso e Nahas (2008), que obtiveram maiores eficiências de solubilização utilizando manitol e ácido glutâmico, como fontes de carbono e de nitrogênio, respectivamente.

Tabela 1. Identificação molecular, P-Ca e P-Fe solubilizado (mg. L⁻¹), pH do meio de cultura e produção de sideróforos por bactérias endofíticas em meio de cultura líquido, depois de 9 dias de crescimento a 28 °C. Os valores apresentados são médias de três repetições.

Isolado	Origem	Espécie	P-Ca (mg. L ⁻¹) ^a	pH ^b	P-Fe (mg. L ⁻¹)	pH ³ P-Fe	Produção de sideróforos
Controle^{***}	-	-	36,20 ^{****}	6,51 a	0,00 g	4,42 a	-
1912	Seiva	Bactéria não cultivada	122,98 f	5,17 f	20,40 f	3,54 d	Carboxilato
1915	Seiva	<i>Bacillus pumilus</i>	114,19 f	5,25 c	42,95 d	3,82 c	Carboxilato
1917	Seiva	<i>Pantoea</i> sp.	150,47 d	4,41 f	54,19 c	3,58 d	Carboxilato
1918	Seiva	<i>Bacillus</i> sp.	111,35 g	4,68 e	49,56 c	3,56 d	Negativa
1920	Seiva	Bactéria não cultivada	193,71 a	4,25 g	50,06 c	3,47 d	Negativa
1921	Seiva	<i>Enterobacter</i> sp.	174,47 b	4,21 g	50,92 c	3,81 c	Carboxilato
1923	Seiva	<i>B. pumilus</i>	111,93 g	5,50 g	52,22 c	3,50 d	Carboxilato
1924	Seiva	<i>Klebsiella</i> sp.	166,27 c	3,99 i	54,45 c	3,22 e	Carboxilato
1925	Seiva	<i>Pantoea ananatis</i>	132,88 e	4,73 e	41,53 d	3,13 e	Negativa
1926	Seiva	Bactéria não cultivada	123,89 f	4,31 g	43,83 d	3,42 d	Negativa
1928	Seiva	<i>Burkholderia gladioli</i>	169,23 b	4,03 i	59,80 b	4,17 c	Carboxilato
1930	Seiva	<i>P. ananatis</i>	129,06 e	4,26 g	-	-	Carboxilato
1931	Folha	<i>Pantoea</i> sp.	134,21 e	4,23 g	57,48 b	3,13 e	Carboxilato
1932	Folha	<i>Pantoea</i> sp.	138,29 e	4,32 g	-	-	Carboxilato
1934	Folha	<i>P. ananatis</i>	80,32 h	4,23 g	62,77 a	3,24 e	Negativa
1935	Folha	Bactéria não cultivada	137,54 e	4,28 e	62,67 a	3,04 e	Carboxilato
1936	Folha	<i>P. ananatis</i>	136,88 e	4,30 g	-	-	Negativa
1937	Folha	<i>P. ananatis</i>	135,90 e	4,24 g	59,33 b	3,26 e	Carboxilato
1939	Folha	<i>E. asburiae</i>	135,92 e	4,28 g	-	-	Negativa
1961	Raiz	<i>P. dispersa</i>	124,33 f	4,54 f	29,66 e	3,43 d	Carboxilato
1976	Raiz	<i>Bacillus</i> sp.	169,50 b	4,14 h	64,89 a	3,57 d	Carboxilato
1979	Raiz	<i>P. ananatis</i>	159,09	5,14	-	-	Carboxilato

Tabela 1 cont. Identificação molecular, P-Ca e P-Fe solubilizado (mg. L⁻¹), pH do meio de cultura e produção de sideróforos por bactérias endofíticas em meio de cultura líquido, depois de 9 dias de crescimento a 28 °C. Os valores apresentados são médias de três repetições.

Isolado	Origem	Espécie	P-Ca (mg. L ⁻¹)*	pH** P-Ca	P-Fe (mg. L ⁻¹)	pH*** P-Fe	Produção de sideróforos
1982	Raiz	<i>Bacillus</i> sp.	167,85 b	4,61 f	57,05 b	3,38 d	Carboxilato
1984	Raiz	<i>P. dispersa</i>	119,77 f	4,71 e	68,67 a	3,22 e	Carboxilato
2007	Seiva	Bactéria não cultivada	-	-	57,77 b	3,63 d	Carboxilato
2008	Seiva	<i>P. ananatis</i>	160,38 c	4,69 e	45,02 d	3,49 d	Carboxilato
2009	Seiva	<i>Bacillus</i> sp.	164,23 c	5,12 c	51,98 c	2,61 f	Carboxilato
2010	Seiva	<i>E. aerogene</i>	175,38 b	4,37 g	-	-	Carboxilato
2012	Seiva	<i>Bacillus</i> sp.	167,89 b	4,16 h	34,35 e	3,49 d	Carboxilato
2081	Folha	<i>B. cereus</i>	148,47 d	4,42 f	43,38 d	3,87 c	Carboxilato
2082	Folha	Bactéria não cultivada	167,97 b	4,94 d	44,61 d	3,53 d	Negativa
2083	Folha	<i>B. methylothrophicus</i>	154,11 d	5,34 c	54,66 c	3,47 d	Carboxilato
2084	Folha	<i>B. subtilis</i>	120,42 f	4,80 e	34,56 e	3,43 d	Carboxilato
2085	Raiz	Bactéria não cultivada	149,75 d	4,69 d	42,43 d	3,46 d	Negativa
2088	Raiz	<i>Bacillus</i> sp.	179,39 a	4,73 e	34,25 e	3,28 e	Carboxilato
2091	Raiz	Bactéria não cultivada	185,15 a	4,14 h	54,09 c	3,56 d	Negativa
2093	Raiz	Bactéria não cultivada	186,13 a	4,04 i	58,35 b	3,53 d	Negativa
2096	Folha	Bactéria não cultivada	149,01 d	4,98 d	51,33 c	3,52 d	Carboxilato
2097	Folha	Bactéria não cultivada	100,82 g	4,69 g	42,84 d	3,57 d	Carboxilato
2099	Raiz	<i>Bacillus</i> sp.	139,57 e	4,25 g	50,65 c	3,45 d	Carboxilato
2100	Folha	<i>Serratia</i> sp.	158,63 c	4,03 i	45,33 d	3,61 d	Negativa
2103	Folha	<i>P. ananatis</i>	134,14 e	4,41 f	60,86 b	3,06 e	Carboxilato
2106	Raiz	<i>B. megaterium</i>	186,17 a	4,19 h	40,53 d	3,44 d	Carboxilato
2107	Raiz	Bactéria não cultivada	191,46 a	4,26 g	47,02 d	4,42 b	Negativa
2108	Raiz	<i>Bacillus</i> sp.	118,24 f	5,00 d	46,89 d	3,84 c	Negativa
2109	Raiz	Bactéria não cultivada	133,57 e	4,76 e	59,47 b	3,35 e	Carboxilato
2110	Folha	<i>Bacillus</i> sp.	181,98 a	3,90 i	59,83 b	3,49 d	Carboxilato
2111	Raiz	<i>Bacillus</i> sp.	176,33 b	4,83 e	64,08 a	2,98 e	Negativa
2112	Raiz	Bactéria não cultivada	140,01 e	4,38 g	54,33 c	3,21 e	Carboxilato

* P solubilizado pelos microrganismos durante 9 dias de incubação.

**pH em água mensurado aos 9 dias de incubação.

***Meio de cultura sem microrganismos.

****Médias seguidas da mesma letra, para cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Scot-Knott a 5% de probabilidade.

Observou-se que para as melhores estirpes solubilizadoras houve uma redução do pH do meio, sugerindo a produção e liberação de ácidos orgânicos pelos microrganismos. Foi observada uma correlação negativa de -0,58 e -0,48 (correlação de Pearson significativa a 5% de probabilidade) entre a liberação de fósforo nas duas fontes testadas (P-Ca e P-Fe) e os valores de pH, respectivamente. A correlação significativa e negativa entre fosfato e acidez, em todos os ensaios, indica que, para haver solubilização, há necessidade da produção de ácidos. Esse mecanismo tem sido amplamente relatado na literatura (BARROSO; NAHAS, 2008; OLIVEIRA et al., 2009; GOMES et al., 2014). Microrganismos solubilizadores de P liberam ácidos orgânicos, resultado da assimilação de carboidratos, que atuam na complexação do cátion do fosfato inorgânico para a liberação do fosfato solúvel (WHITELAW, 2000).

Neste trabalho, dos 49 isolados avaliados em meio de cultura privado de ferro, 69% foram positivos para produção de sideróforo que foi do tipo carboxilato (alteração de cor azul para amarelo claro) (Tabela 1 e Figura 1). De acordo com a natureza química do sítio de ligação ao ferro, os sideróforos podem ser classificados em três classes principais: hidroxamato, catecolato ou carboxilato (SIMIONATO et al., 2010). A biodisponibilidade de ferro microbiano é, em grande parte, determinada pela química de coordenação associada ao sideróforo (BENITE et al., 2002), no entanto, o tipo de sideróforo indica a diferença de mecanismos para solubilização do ferro. Estudos posteriores para quantificar os sideróforos produzidos serão necessários para validação desta característica nas estirpes estudadas.

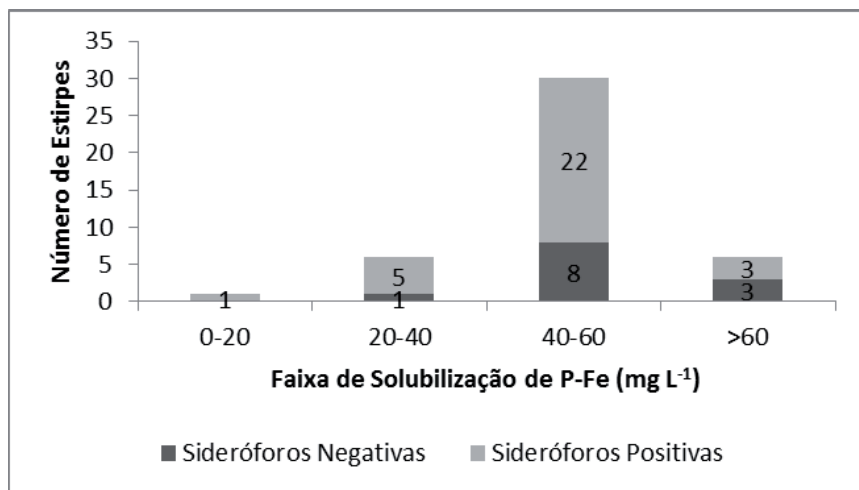


Figura 1. Faixa de solubilização de fósforo em meio de cultura contendo fosfato de ferro em relação ao número de estirpes produtoras de sideróforos.

A produção de sideróforos foi avaliada considerando-se que esta substância orgânica liberada pelos microrganismos pode indiretamente reduzir a adsorção de fósforo às partículas do solo pela sua capacidade de quelar o ferro, disponibilizando o fosfato solúvel para as raízes. O maior número de estirpes com produção positiva de sideróforos se concentrou na faixa de solubilização de P-Fe acima de 40 mgP. L⁻¹ (Figura 2), dentre os mais eficientes nesta característica.

Estes resultados delimitam o potencial desses endofíticos para a aplicação biotecnológica e ou uso como bioinoculantes na agricultura, por apresentarem mais de uma característica desejável para o incremento da produção vegetal. Além disso, produzir substâncias quelantes de ferro endogenamente à planta, ou seja, em ambiente protegido como o interior da planta, pode ser uma vantagem, visto que estas substâncias

podem ser exsudadas via raiz em condição de estresse mineral, facilitando a absorção de P.

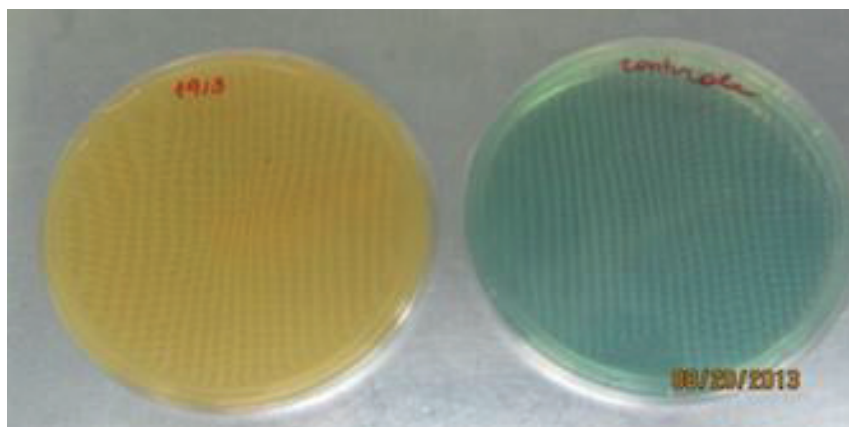


Figura 2. Produção de sideróforos carboxilato, alteração de cor de azul (controle negativo) para amarelo claro (estirpe 1915).

Nossos estudos também sugerem que o microbioma endofítico de plantas de milho é um ambiente propício para se prospectar estirpes de bactérias eficientes na solubilização de P e produção de sideróforos, já que foi possível selecionar seis cepas do gênero *Bacillus* (1976, 2012, 2088, 2106, 2110 e 2111) para estudos posteriores na planta em condições controladas e em campo, visando produção de bioinoculantes. Esses isolados foram selecionados com base nos critérios estudados e também por ser este gênero não patógeno em plantas de milho, diferentemente do gênero *Pantoea* (HARDOIM et al., 2012), além do fato de ser citado na literatura como um gênero tipicamente de endofíticos facultativos.

Conclusões

A população de bactérias provenientes de microbioma endofítica de milho apresenta variação quanto à solubilização das duas diferentes fontes de fósforo P-Ca e P-Fe, predominando os gêneros *Bacillus* e *Pantoea* como os mais eficientes.

Os isolados 2111 e 1976 (*Bacillus* sp.) e o isolado 1984 (*P. dispersa*) apresentaram potencial de solubilização das duas fontes de fósforo (fosfato tricálcio e de ferro).

O principal mecanismo de produção de sideróforos foi do tipo carboxilato, sendo a maioria das estirpes produtoras de sideróforos eficientes na solubilização de P ligado a ferro.

Os endofíticos isolados possuem características significativas para a promoção do crescimento vegetal, podendo, neste sentido, ser considerados como candidatos para futuros testes de inoculação em plantas.

Agradecimentos

À Fapemig, ao CNPq e à Embrapa pelo suporte financeiro

Referências

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFER, A. A.; ZHANG, J. H.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, p. 447-451, 2000.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SIDEMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley, 1987.

BALIGAR, V. C.; FAGERIA, N. K. Nutrient use efficiency in plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 32, p. 921-950, 2001.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 73-83, 2005.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 4, p. 529-535, 2008.

BACON, C. W.; HINTON, D. M. *Bacillus mojavensis*: its endophytic nature, the surfactins, and their role in the plant response to infection by *Fusarium verticillioides*. In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.). **Bacteria in agrobiolgy**: plant growth responses. Berlin: Springer Verlag, 2011. p. 21-39.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. J.; HERNANDEZ, P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, The Hague, v. 378, p. 1-33, 2014.

BENITE, A. M.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideróforos: uma resposta dos microrganismos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1155-1164, 2002.

BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R. A.; ULRICH A.; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 51, p. 215-229, 2005.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

GOLDSTEIN, A.; LESTER, T.; BROWN, J. Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1647, p. 266-271, 2003.

GOMES, E.; SILVA, U.; MARRIEL, I.; OLIVEIRA, C.; LANA, U. Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 13, p. 69-81, 2014.

HAMAYUN, M.; KHAN, S. A.; KIM, H. Y.; CHAUDHARY, M. F.; HWANG, Y. H.; SHIN, D. H.; KIM, I. K.; LEE, B. H.; LEE, I. J. Gibberellin production and plant growth enhancement by newly isolated strain of *Scolecobasidium tshawytschae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 560-565, 2009.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, p. 463-471, 2008.

HARDOIM, P. R.; HARDOIM, C. C. P.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, p. e30438, 2012.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: a review. **Agronomy for Sustainability Development**, Paris, v. 27, p. 29-43, 2007.

MALFANOVA, N.; FRANZIL, L.; LUGTENBERG, B.; CHEBOTAR, V.; ONGENA, M. Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 194, p. 893-899, 2012.

MONTAÑEZ, A.; BLANCO, A. R.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.; SICARDI, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 58, p. 21-28, 2012.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 27, p. 31-36, 1962.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, p. 265-270, 1999.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 399 p.

NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. 1017 p.

NÜBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 5636-5643, 1996.

OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; MUZZI, M. R. S.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARAES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v.41, p.1782–1787, 2009.

PATIL, P. M.; KULIGOD, V. B.; HEBSUR, N. S.; PATIL, C. R.; KULKARNI, G. N. Effect of phosphate solubilizing fungi and phosphorus levels on growth, yield and nutrient content in maize (*Zea mays*). **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, Dharwad, v. 25, p. 58-62, 2012.

PÉREZ-MIRANDA, S.; CABIROL, N.; GEORGE-TÉLLEZ, R.; ZAMUDIO-RIVERA, L. S.; FERNÁNDEZ, F. J. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 70, p. 127-131, 2007.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 897-906, 2001.

RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. **Plant Physiology**, Washington, v. 156, p. 989-996, 2011.

RODRIGUES, R. B.; OZORIO, L. M.; PINTO, C. L. B.; BRANDAO, L. E. T. Opção de troca de produto na indústria de fertilizantes. **Revista de Administração**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 129-140, 2015.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, p. 319-339, 1999.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, p. 827-837, 2006.

SIMIONATO, A. V. C.; SILVA-STENICO, M. S.; TSAI, S. M.; CARRILHO, E. Evidences of siderophores synthesis by grapevine *Xylella fastidiosa*, causal agent of pierce's disease, through instrumental approaches. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, p. 635-641, 2010.

SINGH, H.; REDDY, M. S. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. **European Journal of Soil Biology**, New Jersey, v. 47, p. 30-34, 2011.

SCHWYN, B.; NEILANDS, B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 160, p. 46-56, 1987.

VASSILEV, N.; EICHLER-LÖBERMANN, B.; VASSILEV, A. M. Stress-tolerant P-solubilizing microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 95, p. 851-859, 2012.

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 69, p. 99-151, 2000.

